

VU Research Portal

Active specific immunotherapy for solid tumours

Baars, A.

2007

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Baars, A. (2007). *Active specific immunotherapy for solid tumours*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Kanker

Jaarlijks wordt in Nederland bij ongeveer 70.000 mensen de diagnose kanker gesteld. Kanker is een heterogene groep van aandoeningen die als gemeenschappelijk kenmerk hebben dat de regulatie van celdgroei en/of celdood is verstoord, waardoor een pathologische (= ziekelijke) vermeerdering van cellen optreedt. Kwaadaardige tumoren (= maligniteiten, = kanker) houden zich niet aan de normale anatomische grenzen, maar hebben de neiging door te groeien in omliggende organen en weefsels. Daarnaast heeft het overgrote deel van de kwaadaardige tumoren de neiging uit te zaaien (metastaseren). Bij dit laatste proces raken cellen of celd groepjes los van de oorspronkelijke tumor waarna ze via de bloedbaan of via het lymfesysteem op andere plaatsen in het lichaam terecht komen, waar ze een nieuw tumorgezwel gaan vormen.

Op dit moment is het zo dat in Nederland gemiddeld vier van de zeven mensen bij wie een kwaadaardige ziekte wordt geconstateerd hieraan uiteindelijk komt te overlijden. Gemiddeld is na tien jaar nog 40% in leven, wat een redelijke schatting geeft van de kans op genezing. De kans op genezing is per soort kanker overigens sterk verschillend. Bij sommige vormen van kanker bedraagt de kans op genezing bijna 100%, terwijl dit bij andere maligniteiten zo goed als 0% is. Daarnaast is de vraag hoever de ziekte al is gevorderd op het moment van ontdekking (het ziektestadium) vaak van groot belang voor de kans op genezing. Op enkele uitzonderingen na kan gesteld worden dat de kans op genezing vaak groot is als de ziekte in een vroeg stadium wordt ontdekt, en dat de kans op genezing vrijwel nihil is als de ziekte in een zeer vergevorderd stadium aan het licht komt.

Het immuunsysteem en kanker

Een belangrijke rol van het immuunsysteem is het onschadelijk maken van indringers van buitenaf, zoals bacteriën en virussen. Het immuunsysteem kan deze taak uitvoeren doordat het in staat is onderscheid te maken tussen lichaamseigen eiwitten en lichaamsvreemde structuren. Hoewel tumorcellen van oorsprong lichaamseigen cellen zijn, gedragen zij zich anders dan normale lichaamscellen, en zien ze er ook enigszins anders uit. Dat een tumorcel anders is dan een gewone lichaamscel is een gevolg van het feit dat er in de tumorcel op DNA-niveau veranderingen zijn opgetreden, waardoor er andere eiwitten door de tumorcel gemaakt worden dan door gezonde cellen. Het idee achter immunotherapie bij de bestrijding van kwaadaardige ziekten is dat er zich op/in tumorcellen eiwitten bevinden die zodanig afwijkend zijn van eiwitten die normaalgesproken voorkomen, dat delen van deze eiwitten door het immuunsysteem als lichaamsvreemd beschouwd zouden kunnen worden. Eiwitten die het immuunsysteem als lichaamsvreemd beschouwt worden antigenen (enkelvoud: antigeen) genoemd.

De theorie van de “Immune Surveillance”

Op basis van dit zelfde idee is de theorie van de “immune surveillance” (wellicht te vertalen als continue immunologische bewaking) gebaseerd. Volgens deze theorie ontspreken er in het menselijk lichaam continu cellen in de richting van kwaadaardigheid. Maar, doordat het immuunsysteem deze ontsporingen vrijwel altijd in een zeer vroeg stadium kan opsporen en uitschakelen zou kanker een relatief zeldzame aandoening zijn. Naast veel voorstanders kent deze theorie echter ook tegenstanders. Deze baseren zich onder andere op de waarneming dat bij mensen met een zeer slecht werkend immuunsysteem (bijvoorbeeld mensen met een HIV-besmetting of patiënten die immuunonderdrukkende medicijnen gebruiken) weliswaar vaker kanker voorkomt dan gemiddeld, maar dat dit slechts bepaalde vormen van kanker betreft. Het is dus niet zo dat bij mensen met een slecht werkend immuunsysteem alle vormen van kanker gemiddeld vaker voorkomen. Hoe het ook moge zijn, uit vele onderzoeken is inmiddels duidelijk geworden dat het immuunsysteem in sommige gevallen in staat is tumorcellen te herkennen en onschadelijk te maken.

Het aangeboren en het verworven immuunsysteem

Het immuunsysteem kan grofweg ingedeeld worden in twee subgroepen: 1) het aangeboren (innate) immuunsysteem en 2) het verworven/adaptieve (adaptive) immuunsysteem. Een belangrijk verschil tussen het aangeboren en het adaptieve

immuunsysteem is dat bij een adaptieve immuunreactie, in tegenstelling tot aangeboren immuunreacties, deze specifiek aan een bepaalde ziekteverwekker (= pathogeen) is verbonden. Verworven immuunreacties worden bovendien bij elke volgende ontmoeting met hetzelfde pathogeen steeds effectiever, en dit is bij het aangeboren immuunsysteem niet het geval.

Een voorbeeld van een celtype dat onderdeel uitmaakt van het aangeboren immuunsysteem is de neutrofiele granulocyt. Dit is een zeer veelvoorkomende witte bloedcel, en deze behoort tot de groep van de fagocyterende cellen. Fagocyterende cellen zijn in staat om bacteriën die zich buiten lichaamscellen bevinden te herkennen en te fagocyteren (= opeten).

Bij immunotherapie ter bestrijding van kanker is vooral het adaptieve immuunsysteem van belang, en daarom zal hierop wat dieper worden ingegaan. Binnen het adaptieve immuunsysteem spelen een drietal celtypes een hoofdrol: antigeen-presenterende cellen, T-lymfocyten en B-lymfocyten. Antigenpresenterende cellen (APC) (waarvan de dendritische cellen (DC) de meest krachtige zijn) bevinden zich overal in het lichaam en zijn in staat cellen en celbestanddelen op te nemen, waarna de APC migreert naar een nabij gelegen lymfoïde orgaan, bijvoorbeeld een lymfeklier. Na opname van het celmateriaal knipt de APC de opgenomen eiwitten in kleine stukjes, en “presenteert” deze aan de T-cellen en B-cellen van het lichaam. Alle B- en T-cellen zijn in staat om precies één specifiek niet-lichaamseigen stukje eiwit (antigeen) te herkennen. De B- en T-cellen zijn tijdens hun eigen ontwikkelingsproces zodanig geselecteerd dat elke cel die een lichaamseigen stukje eiwit herkent in een vroeg stadium te gronde gaat. Doordat er in ons lichaam een gigantische hoeveelheid B- en T-cellen aanwezig zijn, is het op theoretische gronden aannemelijk dat vrijwel elk antigeen door een of meerdere B- of T-cellen herkend zal kunnen worden. Nadat een antigeen is herkend door een B-cel gaat deze antistoffen produceren tegen dit antigeen. Als deze antistoffen vervolgens op een andere plaats in het lichaam dit antigeen tegenkomen zullen ze hieraan binden, waarna een immunologische cascade op gang komt waardoor de cel die dit antigeen bevat te gronde gaat. Als het antigeen wordt herkend door een T-cel worden allerhande immuunstimulerende stoffen aangemaakt, en transformeert de aanvankelijk naïeve T-cel tot een zogenaamde cytotoxische T cel. Deze laatste is in staat om cellen die het betreffende antigeen bij zich hebben te identificeren en te doden.

Het effect van de antigeenpresentatie aan T en B cellen door de APC is voor een belangrijk deel afhankelijk van de staat van gealarmeerdheid van de APC (maturation). Is de APC in staat van grote opwinding, dan zal dat veel eerder leiden tot een sterke immunologische reactie dan bij afwezigheid van maturatie. In dat laatste geval zal zelfs vaak tolerantie voor het betreffende antigeen gaan optreden, wat betekent dat een eventuele reeds aanwezige immunologische reactie uitdooft.

Vaccinatie

Zoals gezegd is het grote onderscheid tussen het aangeboren immuunsysteem en het adaptieve immuunsysteem dat als een bepaald antigeen voor de tweede keer wordt herkend door B- of T-cellen, het adaptieve immuunsysteem in staat is om veel sneller te reageren dan wanneer het antigeen nooit eerder is “gezien”. Er bestaat een soort “geheugen” in het adaptieve immuunsysteem. Door dit mechanisme is het bijvoorbeeld zo dat we kinderziektes maar eenmaal in ons leven hoeven door te maken.

Op het principe van deze “geheugen”-functie zijn vaccinaties tegen infectieziekten gebaseerd. Bij vaccinaties wordt een verzwakt micro-organisme -of een deel daarvan- toegediend waardoor het immuunsysteem in staat wordt gesteld een immunologische reactie te ontwikkelen tegen antigenen die aanwezig zijn op dat micro-organisme, zonder dat dit met de ziekmakende verschijnselen van een daadwerkelijke infectie gepaard gaat. Doet zich later een echte infectie met hetzelfde micro-organisme voor, dan zal de gastheer hiertegen in een mum van tijd een adequate reactie op gang brengen -want het immuunsysteem herinnert zich immers de betreffende antigenen- waardoor de infectie in de kiem gesmoord wordt, en de patiënt/gastheer hiervan niets merkt.

Tumorcelvaccinatie

Op dit principe van vaccinatie zijn de onderzoeken in dit proefschrift gebaseerd. In de studies die hier beschreven worden zijn vaccins gebruikt die gemaakt werden van de tumorcellen van patiënten met kanker, te weten melanoom (een agressieve vorm van huidkanker) of colon carcinoom (dikke darmkanker). Patiënten ondergingen een operatie waarbij een gezwel werd verwijderd. Tumorcellen uit dit verwijderde gezwel werden vervolgens verwerkt tot vaccin en met een injectie in de huid van de patiënt toegediend. Voor toediening werden de vaccins met radioactiviteit bestraald, waardoor de tumorcellen niet langer in staat waren zich te vermenigvuldigen en voorkomen werd dat zich als gevolg van het vaccin nieuwe tumoren op de injectieplaats zouden kunnen vormen.

Aan een deel van de vaccins werd een immuunstimulerende hulpstof toegevoegd om er voor te zorgen dat de APC in de huid in maximale staat van paraatheid werden gebracht. Hiervoor werd de bacterie *Bacillus Calmette Guérin* gebruikt, kortweg BCG. Deze verzwakte bacterie is verwant aan de bacterie die tuberculose veroorzaakt, en wordt om die reden soms gebruikt om te proberen mensen te immuniseren tegen TBC. Die effecten staan los van de reden waarom het hier gebruikt is.

De gedachte achter het geven van tumorcelvaccinaties is dat gehoopt wordt dat deze vaccinaties leiden tot vorming van cytotoxische T-cellen welke in staat zijn specifiek een immunologische reactie op gang te brengen tegen eiwitdelen van tumorcellen welke als lichaamsvreemd beschouwd zouden mogen worden (tumor-geassocieerde antigenen: TAA). De hoop is erop gevestigd dat deze cytotoxische T-cellen er vervolgens voor zorgen dat tumorcellen die ondanks de operatie toch nog in het lichaam van de patiënt aanwezig zouden zijn -hetzij in het operatiegebied, hetzij als uitzaaiing- opgeruimd worden. In figuur 2 van de inleiding (hoofdstuk 1) van dit proefschrift staat dit proces grafisch weergegeven.

In **hoofdstuk 1** wordt een overzicht gegeven van de verschillende immunotherapeutische strategieën welke in de loop der jaren door andere onderzoekers voor de bestrijding van kanker zijn toegepast.

In **hoofdstuk 2** wordt een onderzoek beschreven dat werd uitgevoerd bij 81 patiënten met een uitgezaaid melanoom. Bij 38/81 patiënten waren de metastasen beperkt tot het lymfeklierstation in de buurt van de oorspronkelijke tumor (stadium III); bij de rest bevonden de uitzaaiingen zich verderop in het lichaam (stadium IV). Alle patiënten ondergingen een operatie waarbij tumorweefsel werd verzameld voor de productie van tumorcelvaccins. Indien technisch enigszins haalbaar, werd geprobeerd tijdens de operatie al het zichtbare uitgezaaide tumorweefsel te verwijderen. Bij 49 van de 81 patiënten was er na de operatie geen tumorweefsel meer detecteerbaar. Toch werd de kans als heel groot ($>>50\%$) geschat dat er zich in het lichaam van de patiënt nog tumorcellen zouden bevinden, hetzij in het operatiegebied, hetzij in de vorm van andere uitzaaiingen die op dat moment nog niet de detectiegrens van 1 cm hadden bereikt. Uitzaaiingen die nog te klein zijn om met de huidige beeldvormende technieken te kunnen worden waargenomen worden micro-metastasen genoemd.

Een maand na de operatie kregen de patiënten hun eerste vaccin toegediend, bestaande uit 10 miljoen tumorcellen en 10 miljoen BCG bacteriën. Een week later werd een tweede vaccin toegediend waaraan eveneens BCG was toegevoegd, en weer een week later het derde, ditmaal zonder BCG. Verdere vaccinaties -alle zonder BCG- werden gegeven met 3-maandelijks intervallen. Alle vaccins werden in de huid ingespoten; de eerste twee in de benen, de rest in de armen. De bijwerkingen van deze behandeling bestonden uit het ontstaan van een zweer op de plaats van BCG toediening bij het merendeel van de patiënten. Verder voelden veel patiënten zich kortdurend wat griepig. Ernstige bijwerkingen deden zich niet voor.

Bij alle patiënten die ondanks de operatie nog waarneembare uitzaaiingen hadden, leken de vaccins geen effect te hebben. Al deze patiënten overleden spoedig aan de ziekte, en bij geen van hen kon een tijdelijke verkleining van de uitzaaiingen waargenomen worden. Van de 49 patiënten bij wie er na de operatie geen zichtbare tumoren meer waren, bleek na 5 jaar 45% nog in leven, het overgrote deel ziektevrij. Dit resultaat is enigszins beter dan op basis van historische gegevens verwacht had mogen worden. Maar, omdat dit een onderzoek zonder controlegroep was (met alleen een operatie, en dus zonder vaccinaties) is het niet gerechtvaardigd op basis van deze gegevens harde conclusies te trekken.

Van dit onderzoek kon echter wel iets belangrijks geleerd worden. Het bleek namelijk zo te zijn dat zich in de huid van de patiënten óók een ontstekingsreactie voordeed in aansluiting op vaccinaties waaraan geen BCG was toegevoegd. In de vaccins waaraan geen BCG was toegevoegd zaten dus alleen bestraalde tumorcellen. In tegenstelling tot de BCG-bevattende vaccinaties ontstond hier geen zweervorming, maar een soort uit de kluiten gewassen muggenbult. Indien deze bestraalde tumorcellen zouden zijn toegediend aan patiënten die géén voorgaande BCG-vaccinaties hadden gekregen, dan zou zich in de huid geen zichtbare ontstekingsreactie hebben voorgedaan. Het feit dat er wél een ontstekingsreactie zichtbaar werd, suggereert dus herkenning van de tumorcellen door het immuunsysteem, als gevolg van de voorgaande vaccinaties. Nog interessanter was dat de grootte van de ontstekingsreactie in de huid zeer sterk bleek te correleren met de overlevingskans van de patiënten. Hoe groter de ontstekingsreactie, hoe groter de kans om na 5 jaar nog in leven te zijn. Ook dit kan uitgelegd worden als een sterke aanwijzing voor het ontstaan van een sterke anti-tumor-immuniteit als gevolg van de vaccinaties. Helemaal zeker is dit laatste echter niet, omdat het zo

is dat tumorcellen vaak allerlei stoffen produceren die het immuunsysteem onderdrukken. Het is dus niet onmogelijk dat het zo is geweest dat een kleine ontstekingsreactie er een uiting van is geweest dat zich in het lichaam van deze patiënten een grote hoeveelheid (immuunonderdrukkende stoffen producerende) tumorcellen hebben bevonden. In dat geval is de huidreactie dus geen afspiegeling geweest van het al dan niet ontstaan van een krachtige immunologische anti-tumor reactie, maar een afspiegeling van onderdrukking van een immunologische reactie.

Tot slot viel op dat de grootte van de huidreactie niet toenam na de verschillende vaccinaties, en vaak zelfs wat afnam. Dit zou er mogelijk op kunnen duiden dat de vaccinaties waar geen immuunstimulerende hulpstof aan was toegevoegd geen verdere versterking van de anti-tumorimmunitet bewerkstelligden. Mogelijk hebben ze zelfs aanleiding gegeven tot het ontstaan van immunologische tolerantie.

In **hoofdstuk 3** wordt nader onderzoek beschreven dat werd gedaan naar de immunologische reacties die zich voordeden bij de patiënten die meededen aan het in hoofdstuk 2 beschreven onderzoek. Hiertoe was bloed en/of tumormateriaal noodzakelijk, en dit bleek van niet alle melanoompatiënten voorradig. Primair doel van dit onderzoek was om te testen of de tumorcelvaccinaties daadwerkelijk hadden geleid tot grotere aantallen cytotoxische T cellen in het bloed van de patiënten, gericht tegen tumorantigenen (antigeen-specifieke cytotoxische T cellen: ASCTC). Om verstoring van de gegevens door immuunonderdrukkende stoffen zoveel mogelijk te vermijden werden alleen de patiënten geselecteerd die na hun operatie ogenschijnlijk ziektevrij waren. Uiteindelijk kon van 25 melanoompatiënten bloed en/of tumormateriaal onderzocht worden. Van 9 patiënten was er alleen bloed voorradig; van 8 alleen tumor, en van nog eens 8 zowel bloed als tumor.

Met behulp van een speciale techniek werden vergelijkingen gemaakt tussen bloed dat was afgenomen voorafgaand aan de eerste vaccinatie en bloed afgenomen na de 3e vaccinatie. Voorafgaand aan de eerste vaccinatie werden bij 5/17 melanoompatiënten ASCTC aangetroffen in het bloed, in kleine aantallen. Echter, in tegenstelling tot wat we aanvankelijk verwacht hadden, bleek de situatie na de derde vaccinatie volkomen ongewijzigd. Het was dus niet zo dat er als gevolg van de vaccinaties steeds grotere hoeveelheden ASCTC in het bloed aangetroffen werden. Er leek feitelijk helemaal niets te gebeuren.

Daarnaast bleek het wel of niet aanwezig zijn van ASCTC in het bloed geen enkele voorspellende waarde te hebben voor het klinisch beloop van de patiënten.

Vervolgens bedachten we dat adequaat functionerende ASCTC eigenlijk helemaal niet in het bloed zouden moeten voorkomen, maar in plaats daarvan “aan het werk” zouden moeten zijn in de tumor. Om hier meer informatie over te krijgen hebben we tumormateriaal onderzocht dat was verkregen bij de eerdergenoemde operaties. Dit materiaal bestond uit tumorcelvaccins welke niet voor vaccinatie waren gebruikt. Doel van dit deel van het onderzoek was te bekijken of er 1) een correlatie bestaat tussen ASCTC in de tumor en ASCTC in bloed en 2) om te kijken of de hoeveelheid ASCTC in de tumor een relatie heeft met klinische prognose.

In 12/16 tumorspecimens konden ASCTC aangetoond worden, en over het algemeen in veel grotere aantallen dan in bloed. Belangrijk was de constatering dat de aanwezigheid van intra-tumorale ASCTC een positieve correlatie met overleving liet zien, terwijl een dergelijke relatie, zoals gezegd, eerder niet gevonden werd voor ASCTC in het bloed en overleving. Mogelijk nog belangrijker was de vondst dat ASCTC voor bepaalde antigenen nooit tegelijkertijd in bloed en tumor voorkwamen. Er bestond hiertussen een omgekeerde correlatie, wat bewijst dat het na immunotherapie voor kanker zinloos is om in bloed onderzoek te doen naar ASCTC.

In **hoofdstuk 4** wordt een onderzoek beschreven dat werd uitgevoerd bij 56 patiënten met dikke darmkanker. Al deze patiënten ondergingen een operatie waarbij het aangedane stuk darm door de chirurg werd verwijderd. Standaard worden bij een dergelijke operatie ook een aantal lymfeklieren mee verwijderd. Als zich in deze lymfeklieren uitzaaiingen bevinden maakt dit de kans op aanwezigheid van micro-metastasen op een andere plaats in het lichaam een stuk groter dan wanneer deze lymfeklieren tumorvrij blijken te zijn. In het eerste geval is de kans op micro-metastasen 40-80%, afhankelijk van het aantal aangedane klieren, in het laatste geval ongeveer 25%. Aan dit onderzoek deden alleen darmkankerpatiënten mee met uitzaaiingen in de lymfeklieren (Stadium III, Dukes C).

De patiënten kregen in totaal 4 vaccins toegediend, waarbij aan de eerste twee wederom BCG was toegevoegd als immuunstimulerende hulpstof. De eerste drie vaccins werden in week 5-7 na de operatie toegediend. Een vierde en laatste booster- (“oppepper”) vaccinatie werd 9 maanden na de operatie

gegeven. Echter, naast de vaccinatiebehandeling kregen de patiënten ook de standaardbehandeling die patiënten met Dukes C darmkanker altijd krijgen, te weten 6 chemokuren met het middel 5-FU. Deze chemotherapie heeft als doel micro-metastasen om zeep te brengen, en daardoor de kans op uiteindelijke genezing te vergroten. Dat deze vorm van chemotherapie (*adjuvante* chemotherapie) bij dit stadium van darmkanker klinisch effectief is, is in meerdere grote onderzoeken onomstotelijk vast komen te staan.

Het huidige onderzoek had enerzijds als doel te onderzoeken of zich onverwachte bijwerkingen zouden voordoen, maar vooral om te bekijken of de anti-tumorimmunitet die wordt opgebouwd door de vaccinatiebehandeling niet teniet wordt gedaan door de chemotherapeutische behandeling. Immers, chemotherapie heeft vaak (tijdelijk) een sterk destructief effect op het immuunsysteem. Het effect van chemotherapie op het geheugen van het adaptieve immuunsysteem lijkt echter beperkt, wat onder andere blijkt uit het feit dat zich bij mensen die chemotherapie hebben gehad bijvoorbeeld niet opnieuw kinderziektes voordoen. Hoe dan ook, omdat het plan bestond een heel groot (en kostbaar) onderzoek naar de combinatiebehandeling van chemotherapie plus vaccinatietherapie bij patiënten met Dukes C darmkanker te starten, was het van belang zekerheid te verkrijgen over deze eventuele negatieve effecten.

Onverwachte bijwerkingen deden zich niet voor, al werd de chemotherapeutische behandeling door veel patiënten als erg belastend ervaren. Bij één patiënt waren de bijwerkingen van de chemotherapie zelfs zodanig heftig, dat deze de dood tot gevolg hadden.

De opgebouwde anti-tumor-immunitet is heel erg lastig te onderzoeken, zoals onder andere uit hoofdstuk 3 moge blijken. De tot op heden als meest betrouwbaar beschouwde parameter voor anti-tumorimmunitet is de grootte van de ontstekingsreactie in de huid na toediening van antigeen, wat, zoals in hoofdstuk 3 beschreven, een sterke correlatie vertoont met de kans op overleving. Om het effect van de chemotherapie te onderzoeken werden daarom de huidreacties na vaccinaties 3 en 4 met elkaar vergeleken. Immers, daartussenin hadden de patiënten de 6 kuren chemotherapie gekregen. Na vaccinatie 3 was de huidreactie gemiddeld 20.3 mm groot, en na vaccinatie 4 was deze gemiddeld 18.4 mm. Hoewel dit een statistisch significant verschil bleek te zijn, mag toch geconcludeerd worden dat chemotherapie slechts een zeer beperkt negatief effect heeft op door vaccinatie geïnduceerde anti-

tumorimmunitet. We hebben geen gegevens over het lange-termijn klinisch beloop van de 56 patiënten.

In de loop der jaren is het steeds duidelijker geworden dat het van groot belang is om bij elke vaccintoediening een immunologische hulpstof mee te injecteren. In de hier beschreven studies werd zoals gezegd voor dit doel BCG gebruikt, een krachtige immuunstimulerende hulpstof waar veel ervaring mee is opgedaan. Echter, de huidzweren die BCG vrijwel onvermijdelijk tot gevolg heeft maken dat het middel niet erg geschikt is om met grote regelmaat aan dezelfde patiënt toe te dienen. Het is niet helemaal duidelijk welk bestanddeel van bacteriën resulteert in de sterke immunologische reactie. Lange tijd is gedacht dat het vooral bacteriële celwandbestanddelen waren die hiervoor zorgden. Enige tijd geleden is echter vast komen te staan dat ook bacterieel DNA rechtstreeks aanleiding kan geven tot immuunstimulatie, zowel bij muizen als bij mensen. Het is echter onduidelijk of deze bacteriële DNA-fractie zijn effecten (ook) sorteert via de menselijke huid, of dat deze op andere plaatsen in het lichaam ontstaan. Voor het ontwikkelen cq selecteren van een bruikbare hulpstof die met grote frequentie toegepast kan worden, is het dus van belang om meer kennis te vergaren over de mechanismen waarmee bacteriën immunologische activatie van APC (in dit geval dendritische cellen) in de huid bewerkstelligen.

In **hoofdstuk 5** worden verschillende potentiële alternatieven voor BCG met elkaar vergeleken in een menselijke-huidmodel. Hiervoor werd gebruik gemaakt van lappen gezonde menselijke huid die we verkregen via de afdeling plastische chirurgie, van patiënten die een borstverkleiningsoperatie of een buikwandcorrectie hadden ondergaan. In deze huid werden de volgende stoffen met elkaar vergeleken: Medium (het standaard oplosmiddel; de negatieve controle), BCG, GM-CSF + IL4 (een combinatie van immuunstimulerende stoffen die de laatste jaren als de “gouden standaard” bij dit soort experimenten beschouwd wordt), LPS (een representant van de bacteriële celwand) en CpG (een representant van bacterieel DNA). Onmiddellijk nadat deze stofjes in de huid waren ingespoten in het laboratorium werd op de plaats van de injectie een biopt genomen, waarna het biopt in een kweekvloeistof werd gelegd. De eventueel geactiveerde dendritische cellen (DCs) in de huid werden hierdoor in staat gesteld vanuit de huid naar de kweekvloeistof te migreren. Na activatie gaan DCs immers normaalgesproken op reis naar een regionaal lymfoïde orgaan, zoals bijvoorbeeld een lymfeklier. Na 48 uur werden de huidbiopten

verwijderd, en konden de DCs uit de kweekvloeistof worden geïsoleerd voor verdere analyse.

Deze onderzoeken lieten zien dat BCG en LPS ongeveer even sterk activerend effect op de DCs hadden, en dat CpG geen verschil liet zien ten opzichte van de negatieve controle met medium. Daarnaast werd bekeken of de receptoren voor LPS en CpG, respectievelijk Toll Like Receptor (TLR)-4 en TLR-9 in de huid aanwezig waren. TLR-4 was in ruime mate aantoonbaar, maar TLR-9 werd niet gevonden, overeenkomend met de verschillen die eerder bij de activatieproeven waren gevonden. Geconcludeerd kon dus worden dat, wanneer men op zoek is naar een vervangende huid-DC-stimulator in plaats van BCG, stoffen die activatie bewerkstelligen via TLR-4 te verkiezen zijn boven stoffen die werken via de TLR-9 receptor.

Tenslotte worden in **hoofdstuk 6** een aantal strategieën beschreven die mogelijk in de toekomst zouden kunnen leiden tot verbetering van de resultaten die in dit proefschrift werden beschreven. Vooral een aantal combinatiebehandelingen, waarbij de vaccinatiebehandeling wordt gecombineerd met toediening van stoffen die T cellen oppeppen, en/of er voor zorgen dat deze langere tijd actief blijven, worden als veelbelovend beschouwd. Bij proefdieren hebben dergelijke combinatiebehandelingen tot verbluffende resultaten geleid, die zeker navolging verdienen in experimenten bij de mens.

Samenvattend moet gesteld worden dat er nog geen definitieve conclusies getrokken kunnen worden over het klinische nut van tumorcelvaccinaties, al dan niet in combinatie met andere behandelingen. Om hier wel zekerheid over te krijgen is nog heel veel onderzoek nodig. Dat neemt niet weg dat er zeker redenen zijn voor optimisme.